

复方壳多糖组织工程真皮促血管生成活性的研究

周凌 伍津津 鲁元刚 朱堂友

组织工程皮肤作为皮肤替代物覆盖创面,能否有效促进血管形成一直是学术界关注的重点。为了解复方壳多糖组织工程真皮的促血管生成活性,笔者采用氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)掺入法,对复方壳多糖组织工程真皮条件培养基促内皮细胞增生的能力进行了观察,拟为组织工程皮肤血管化的进一步研究提供实验依据。

1 材料与方

1.1 主要试剂和仪器

DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),内皮细胞无血清培养基(北京清原昊生物科技有限公司),壳多糖、硫酸软骨素、透明质酸(美国 Sigma 公司),人血管内皮生长因子(VEGF)试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司分装),³H-TdR(上海原子核研究所),液体闪烁计数器(美国 Beckman 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离与培养 参照文献[1]方法进行成纤维细胞(Fb)的分离和培养。将 Fb 按 2.5×10^5 个/cm² 接种于 24 孔板,共 3 个复孔。吸取培养 48 h 液体, -20 °C 保存。人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的分离和培养按文献[2]方法进行。

1.2.2 胶原凝胶组织工程真皮的制备 参照文献[1]方法进行,在胶原凝胶中按 2.5×10^5 个/cm² 接种 Fb,共 3 个复孔。吸取培养 48 h 液体, -20 °C 冻存。

1.2.3 复方壳多糖组织工程真皮的制备 按文献[3]方法进行,在胶原-壳多糖-糖胺聚糖凝胶中按 2.5×10^5 个/cm² 接种 Fb,共 3 个复孔。吸取培养 48 h 液体, -20 °C 冻存。

1.2.4 条件培养基的配制 对照组:含体积分数 10% DMEM 的内皮细胞无血清培养基;实验 1 组:含体积分数 10% 的单层 Fb 培养液的内皮细胞无血清培养基;实验 2 组:含体积分数 10% 复方壳多糖真皮培养液的内皮细胞无血清培养基;实验 3 组:含体积分数 20% 复方壳多糖真皮培养液的内皮细胞无血清培养基。

1.2.5 各培养液中 VEGF 含量的检测 采用酶联免疫吸附测定法,操作按说明书进行。

1.2.6 ³H-TdR 掺入法测量复方壳多糖组织工程真皮促 HUVEC 增殖能力 HUVEC 按 2×10^4 个/孔接种于 24 孔板,分别加入 4 种条件培养基,第 3 天每孔加入 37 kBq ³H-TdR,24 h 后胰蛋白酶消化细胞,液体闪烁计数器计数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计学软件进行方差分析。

基金项目:国家高技术研究发展计划(2003AA205022);重庆市科技计划项目(7897)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科

通讯作者:伍津津,Email:wjjj@163.com,电话:023-68757816

2 结果

2.1 各培养液中 VEGF 含量比较

复方壳多糖真皮和胶原凝胶真皮培养液中 VEGF 含量均高于单层 Fb 培养液 ($P < 0.05$)。复方壳多糖真皮与胶原凝胶真皮分泌的 VEGF 含量比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 1。

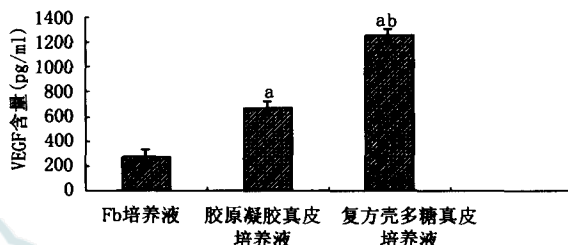


图 1 各培养液中血管内皮生长因子(VEGF)含量比较。与单层成纤维细胞(Fb)培养液比较,a: $P < 0.05$;与胶原凝胶真皮培养液比较,b: $P < 0.01$

2.2 各条件培养基促 HUVEC 增殖能力比较

实验 2、3 组促 HUVEC 增殖能力与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。实验 1 组 HUVEC 的增殖能力明显低于实验 2、3 组 ($P < 0.01$)。实验 3 组明显高于实验 2 组 ($P < 0.05$)。见图 2。

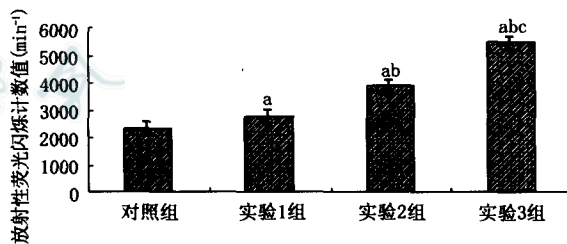


图 2 各条件培养基促人脐静脉内皮细胞增殖能力比较。与对照组(体积分数 10% DMEM 无血清培养基)比较,a: $P < 0.01$;与实验 1 组(体积分数 10% 成纤维细胞培养液无血清培养基)比较,b: $P < 0.01$;与实验 2 组(体积分数 10% 复方壳多糖无血清培养基)比较,c: $P < 0.05$

3 讨论

Fb 分泌细胞因子刺激血管生成,是伤口修复的必要过程。在其分泌的多种细胞因子中,VEGF 是最重要的促血管生成因子。本研究结果表明,Fb 三维培养时分泌的 VEGF 远高于单层培养。三维培养促进 Fb 分泌 VEGF,不仅使 Fb 数量增多,而且使细胞外基质(ECM)沉积。ECM 不仅为组织的生长提供物理支撑,也控制 Fb 的增殖及其功能的发挥^[4]。ECM 可上调 VEGF 的分泌^[5]。胶原是 ECM 的主要成分,其分子结构在细胞间通讯和信号转导中发挥重要作用。在 Fb 分泌生长因子作用于自身时,三维结构可能有利于维持这种

Fb—细胞因子—Fb 生物链。本研究表明,加有壳多糖的真皮能促进 VEGF 的分泌,可能是因为壳多糖刺激 Fb 增殖和通过 ECM 促进 VEGF 的分泌。

本研究证明,复方壳多糖组织工程真皮条件培养基能促进内皮细胞增殖,且具有剂量依赖性。该作用是通过多种细胞因子协同完成的,其中起重要作用的有 VEGF 及成纤维细胞生长因子 2 等。VEGF 是其中主要的促血管生成因子,其他重要因子除直接作用于内皮细胞外,都可通过增强 VEGF 的表达间接促进内皮细胞增殖^[6,7]。三维培养时,ECM 能够显著促进 Fb 的增殖,促使其分泌多种促血管生成因子,这些因子各自或与种子细胞相互联系,共同促进内皮细胞的增殖,有利于移植后伤口的新生血管生成,加速伤口愈合。

参考文献

[1] 伍津津,刘荣卿,叶庆怡,等.成纤维细胞胶原凝胶培养研究.第三军医大学学报,1999,21(1):16-17.
 [2] 周凌,伍津津,鲁元刚,等.人脐静脉内皮细胞的分离培养和

冻存.重庆医学,2006,35(3):226-227.
 [3] 朱堂友,伍津津,胡浪,等.壳多糖-胶原-糖胺聚糖凝胶人工皮肤的制备.重庆医学,2002,31(10):940-942.
 [4] Eckes B, Zigrino P, Kessler D, et al. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. Matrix Biol, 2000, 19(4): 325-332.
 [5] Tang Y, Nakada M, Kesavan P, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinase. Cancer Res, 2005, 65(8): 3193-3199.
 [6] Rabie AB, Lu M. Basic fibroblast growth factor up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor during healing of allogeneic bone graft. Arch Oral Biol, 2004, 49(12): 1025-1033.
 [7] Worden B, Yang XP, Lee TL, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor differentially regulates expression of proangiogenic factors through Egr-1 in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res, 2005, 65(16): 7071-7080.

(收稿日期:2007-02-06)

(本文编辑:张红)

高乌甲素用于烧伤创面换药的镇痛治疗

蔡少甫 郑庆亦 林惠卿 陈锦河 郑健生 邹紫红 蔡林碧珍

1 资料与方法

1.1 临床资料

2006 年 2—10 月,笔者单位收治的 80 例成年烧伤患者中男 47 例、女 33 例,均为伤后 24 h 内入院的混合 II 度烧伤患者。年龄 18 ~ 59 (37 ± 15) 岁,烧伤总面积 11% ~ 30% [(17 ± 6)%] TBSA。致伤原因:火焰烧伤 41 例,热液烫伤 35 例,化学烧伤 4 例。

1.2 治疗方法

患者入院后,创面局部涂抹质量分数 1% 磺胺嘧啶银霜并包扎。患者签署知情同意书。在第 1、2 次创面换药前 30 min,按照随机双盲试验法给予高乌甲素(福州海王福制药有限公司,批号 20051201)或等渗盐水(笔者医院药剂科,批号 051206)。采用交叉试验法,即 4 mg 高乌甲素与 2 ml 等渗盐水每次 1 种,交替进行肌内注射,共 40 例患者。另外 40 例患者采用相同交叉试验方式,但高乌甲素、等渗盐水用量加倍。试验期间,患者不使用其他镇痛或镇静药物。第 2 次创面换药时间在第 1 次换药 24 h 后,由同一位医师操作。

1.3 观察指标

采用视觉模拟评定方式(VAS),根据患者感受评定每次用药前,用药后 30 min(换药开始前),换药过程中,换药后 1、3、5 h 的疼痛程度,同时观察记录患者心率、呼吸频率、血压、血氧饱和度变化和其他不良反应发生情况。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计分析软件,组内比较采用配对 *t* 检验,组间比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

80 例患者用药前 VAS 疼痛评分相近 ($P > 0.05$)。每例患者在用药后 30 min、换药过程中和换药后 1、3 h,应用高乌甲素与应用等渗盐水比较,VAS 疼痛评分均明显减少 ($P < 0.01$);换药过程中的 VAS 评分平均值分别减少 2.0 和 2.5 ($P < 0.01$)。上述观察时相点下,应用不同剂量高乌甲素的患者,其心率、呼吸频率、血压、血氧饱和度差异无统计学意义 ($P > 0.05$),亦未见明显的不良反应。见表 1。

表 1 高乌甲素用于烧伤创面换药前后患者疼痛评分的比较(分, $\bar{x} \pm s$)

药品名	用量	例数	用药前	用药后 30 min	换药过程中	换药后时间(h)		
						1	3	5
高乌甲素	4 mg	40	2.1 ± 1.1	1.4 ± 0.8 ^{ab}	3.4 ± 1.4 ^a	1.9 ± 0.8 ^a	1.6 ± 0.7 ^{ab}	1.9 ± 0.9
等渗盐水	2 ml		2.0 ± 0.9	1.9 ± 1.0	5.4 ± 1.8	3.0 ± 1.1	2.2 ± 0.9	2.2 ± 1.1
高乌甲素	8 mg	40	2.2 ± 1.2	1.2 ± 0.7 ^{ab}	2.7 ± 1.2 ^{ac}	1.7 ± 0.7 ^a	1.4 ± 0.5 ^{ab}	1.6 ± 0.7 ^{ab}
等渗盐水	4 ml		2.1 ± 1.3	2.0 ± 1.4	5.2 ± 1.9	2.9 ± 1.2	2.3 ± 1.0	2.3 ± 1.2

注:与同一交叉组使用等渗盐水比较,a: $P < 0.01$;与本组用药前比较,b: $P < 0.01$;与使用 4 mg 高乌甲素比较,c: $P < 0.05$